

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2003年9月25日 (25.09.2003)

PCT

(10)国際公開番号
WO 03/078631 A1

(51)国際特許分類7: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, (74)代理人: 安富 康男, 外(YASUTOMI,Yasuo et al.); 〒
C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/18
532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番
20 号 中央ビル Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP03/02620

(22)国際出願日: 2003年3月6日 (06.03.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2002-71592 2002年3月15日 (15.03.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 鎌淵化
学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
Osaka (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 丹羽 英夫
(NIWA, Hideo) [JP/JP]; 〒674-0084 兵庫県 明石市 魚
住町西岡 2 5 6 8 - 3 Hyogo (JP). 山下 寅司 (YA-
MASHITA, Kenji) [JP/JP]; 〒761-8003 香川県 高松市
神在川窓町 3 3 2 - 3 Kagawa (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENES

(54)発明の名称: 新規遺伝子

WO 03/078631 A1
(57)Abstract: It is intended to detect and screen proliferative insulin-producing cells and to differentiate and proliferate the insulin-producing cells, precursor cells thereof or cells analogous thereto. Genes expressed specifically in the pancreas of a PPHI patient, which are seemingly spontaneous proliferation models of pancreatic β cells, are detected and, by searching for on a base sequence database, three novel genes are found out. Using these genes, gene products thereof or gene sequences thereof, insulin-producing cells under proliferation can be detected by, for example, Northern analysis or RT-PCR. By transferring these genes into appropriate cells by genetic engineering techniques, moreover, these cells can be differentiated into insulin-producing cells.

(57)要約: 本発明の目的は、増殖能を有するインスリン産生細胞を検出し選抜すること、さらに、インスリン産生細胞及びその前駆細胞、あるいはそれと類縁の細胞を分化・増殖させることである。本発明は、膵 β 細胞の自然増殖モデルと考えられる PPHI 患者の膵臓に特異的に発現している遺伝子を検出し、塩基配列データベースを検索したところ、3種の新規遺伝子を見出したことによる。本発明によれば、これらの遺伝子、遺伝子産物、あるいは遺伝子配列を用いて、たとえば、ノーザン解析やRT-PCRによって増殖しているインスリン産生細胞を検出すことができる。また、これらの遺伝子を適当な細胞に遺伝子工学的手法により導入し、インスリン産生細胞に分化させることができる。

BEST AVAILABLE COPY

明細書

新規遺伝子

技術分野

5 本発明は複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団から増殖しているインスリン産生細胞を検出する技術に関わる。また、本発明はインスリン産生細胞である胰 β 細胞及びその前駆細胞、あるいは胰 β 細胞と類縁の細胞、たとえば神経細胞等を増殖させる技術に関わる。

10 背景技術

胰 β 細胞は血糖値を降下させる唯一のペプチドホルモンであるインスリンを产生する器官である。何らかの原因により胰 β 細胞のインスリン産生能が損なわれると血糖値を正常に保つことが不可能となり糖尿病を発症する。インスリン産生能が損なわれた糖尿病患者にインスリン産生能を回復させ、血糖値を正常に制御するためには、インスリン産生能を有する細胞を移植することが根本的な治療法となる。

インスリン産生細胞の供給源としては死体の脾臓、あるいは近い将来実用化されようとしている胚性幹細胞（ES細胞）または間葉系幹細胞から分化させたインスリン産生能を有する細胞等が考えられる。胚性幹細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来する細胞でほぼすべての組織、細胞に分化する能力を有している。また、間葉系幹細胞は骨髄、血液、真皮、骨膜等に見出される多分化能を有する細胞である。近年、これらの細胞から、試験管内及び生体内で人為的にインスリン産生細胞や神経細胞、心筋細胞等の機能を有する細胞を分化させうることが示されている。しかし、これらの組織あるいは細胞集団は供給に限りがあり糖尿病患者の治療に充分な細胞数を確保することは困難であると考えられる。そこでインスリン産生細胞あるいはその供給源となる細胞を増殖させることが求められる。

そのような効果を期待できる手法としてHGF（H e p a t o c y t e g r o w t h F a c t o r）、Reg蛋白質、ベータセルリソーム等の細胞分化・増殖因子を供給源となる細胞に作用させることが考えられる（Otonkoskiら、

D i a b e t e s 43巻、947-953頁、1994年、W a t a n a b e
ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 91巻、3589-35
92頁、1994年、Y a m a m o t o ら、D i a b e t e s 49巻、202
1-2027頁、2000年)が、現在までのところ実際の治療に適用できるよ
5 うな因子は見出されていない。

また、このような細胞分化・増殖因子を用いてインスリン産生細胞を含む細胞
集団を増殖させてもその中から真に有効な細胞、すなわち増殖能を有するインス
リン産生細胞だけを治療に用いることが望まれるが、このような細胞を選抜する
ための有効な方法は今までのところ明らかにされていない。

10

発明の要約

本発明が解決しようとしている課題は、細胞分化・増殖因子等を用いて治療に
必要な数のインスリン産生細胞を含む細胞集団から目的の細胞、すなわち増殖能
を有するインスリン産生細胞を検出する方法、さらにはそれらを選抜するための
15 方法を提供すること、及び糖尿病等生体が産生する生理活性物質の絶対的不足に
起因する疾患の治療のためにインスリン産生細胞である脾 β 細胞、あるいはそれと類縁の細胞、たとえば神経細胞等をより効率的に分化・増殖させる方法を提
供することにある。

本発明は、P H H I 患者の脾臓で特異的に発現している新規な遺伝子、および
20 その遺伝子から翻訳される蛋白質、そしてその利用法に関する。

本発明の蛋白質は、(1) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質、または、(2) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質である。

本発明の新規な遺伝子は、(1) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸
25 配列からなる蛋白質をコードするDNA、(2) 配列番号4、5または6で表さ
れる塩基配列からなるDNA、(3) 配列番号4の174~904番目の塩基配
列からなるDNA、配列番号5の79~2115番目の塩基配列からなるDNA
若しくは配列番号6の28~384番目の塩基配列からなるDNA、または、(4)
配列番号4、5または6で表される塩基配列の一部からなるDNAであって、

少なくとも、(3)の部分配列領域のDNAの塩基配列を有するDNAである。

本発明の新規な遺伝子及び蛋白質の利用法は、(1)本発明の新規なDNAを用いて、増殖しているインスリン産生細胞を検出する方法、(2)新規なDNAを組み込んだベクターより得られる形質転換体、(3)新規なDNAを、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して胚性幹細胞または間葉系幹細胞を分化させる方法、(4)新規なDNAを、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を増殖させる方法である。(3)の方法、及び(4)の方法においては、胚性幹細胞または間葉系幹細胞が生体の生理機能を有する細胞であることが好ましい。更に、(3)の方法においては、分化した細胞がインスリン産生細胞や神経細胞であることが好ましい。

また、本発明の蛋白質または新規な遺伝子がコードする蛋白質を抗原として認識する抗体もまた、本発明の1つである。

更に、該抗体を用いた疾患の診断法もまた、本発明の1つである。本発明の診断法における目的の疾患としては、細胞増殖性の疾患、膵臓の疾患、神経系の疾患、家族性持続性過インスリン性低血糖症等が挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、家族性持続性過インスリン性低血糖症患者の膵臓に特異的なNC1、NC2及びNC3遺伝子の発現をノーザン解析により調べた結果を示す図である。

図2は、細胞の分化に伴うNC3遺伝子の発現変化をノーザン解析により調べた結果を示す図である。

図3は、NC1遺伝子を強制発現させたPC12細胞の形態変化を示す図である。

25

発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

本発明者らは、増殖しているインスリン産生細胞、または膵 β 細胞で特異的に発現している遺伝子の検索を行うため、このような遺伝子が発現している可能

性の高い組織として家族性持続性過インスリン性低血糖症 (p e r s i s t e n t h y p e r i n s u l i n e m i c h y p o g l y c e m i a o f i n f a n c y ; P H H I) 患者の膵臓を選んだ。P H H I は n e s i d i o b l a s t o s i s とも呼ばれるヒトの遺伝性疾患であり、膵 β 細胞上のカリウムチャネルの一部に変異があることが知られている。このため、この疾患の患者の膵 β 細胞は、常にインスリンの分泌が促されている状態になっており、重篤な低血糖症状を呈する (S c i e n c e , 2 6 8 , 4 2 6 (1 9 9 5)) 。また、P H H I 患者では高い血中インスリン濃度とともにランゲルハンス島、特に β 細胞の過形成が見られるが、これは癌細胞のように形質転換した細胞とは明確に区別される。このため、P H H I 患者の膵臓は膵 β 細胞の自然増殖モデルであるとされている。

したがって、本発明者らは、P H H I 患者の膵臓で特異的に発現している遺伝子を同定すれば、それは増殖している膵 β 細胞を検出するためのマーカーとなり得る上、前駆体の細胞から膵 β 細胞に分化させるあるいは膵 β 細胞を増殖させる分子をコードしていることも期待できると考え、P H H I 患者の膵臓及び健常人の膵臓から R N A を抽出し、それぞれの組織で発現している遺伝子の c D N A を合成して遺伝子サブトラクションを行い、P H H I 患者の膵臓で特異的に発現している新規な遺伝子を取得することに成功した。

すなわち本発明は、P H H I 患者の膵臓で特異的に発現している新規な遺伝子、およびその遺伝子から翻訳される蛋白質、そしてその利用法に関する。

本発明のD N A としては、(1) 配列番号 1 、 2 または 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするD N A 、(2) 配列番号 4 、 5 または 6 で表される塩基配列からなるD N A 、(3) 配列番号 4 の 1 7 4 ~ 9 0 4 番目の塩基配列からなるD N A 、配列番号 5 の 7 9 ~ 2 1 1 5 番目の塩基配列からなるD N A または配列番号 6 の 2 8 ~ 3 8 4 番目の塩基配列からなるD N A 。

(4) 配列番号 4 、 5 または 6 で表される塩基配列の一部からなるD N A であつて、少なくとも、上記(3)のD N A の塩基配列を有するD N A 、が挙げられる。

ここで、(2)の配列番号 4 、 5 または 6 で表される塩基配列からなるD N A はいずれも、本発明において初めて見いだされた新規な遺伝子である。これら新

規な遺伝子は、以下に述べる方法によって取得できた。

P H H I 患者の脾臓及び健常人の脾臓から酸性フェノール法により R N A を抽出し、ポリ A (+) R N A を精製した後、逆転写酵素を用いてそれぞれの組織に由来する c D N A を合成する。これらの c D N A を材料として H u b a n k と S 5 c h a t z の方法 (N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 2 , 5 6 4 0 (1 9 9 3)) により遺伝子サプトラクションを行い、 P H H I 患者の脾臓で特異的に発現している遺伝子を検出する。今回、特異的遺伝子の塩基配列を決定し、塩基配列データベースを検索したところ、特異的遺伝子のうち少なくとも 3 種類の遺伝子は新規遺伝子、即ち機能が明らかになっていない遺伝子であることが確認された。
10

データベース検索により新規遺伝子であることが確認された 3 種類の遺伝子をそれぞれ N C 1 、 N C 2 、及び N C 3 と名づけ、それらの塩基配列を配列番号 4 (N C 1) 、 5 (N C 2) 、及び 6 (N C 3) に示した。また、それらの遺伝子から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を塩基配列から予測し、配列番号 1 (15 N C 1) 、 2 (N C 2) 、及び 3 (N C 3) に示した。

本発明においては、上記新規遺伝子の塩基配列の一部分の D N A を用いても、後述する目的に利用できる。ここでいう、一部分の塩基配列を有する D N A とは目的を達することができれば特に限定されるものではないが、具体的には、配列番号 4 の 1 7 4 ~ 9 0 4 番目の塩基配列からなる D N A 、配列番号 5 の 7 9 ~ 2 20 1 1 5 番目の塩基配列からなる D N A または配列番号 6 の 2 8 ~ 3 8 4 番目の塩基配列からなる D N A が挙げられ、また該部分配列領域を含む配列番号 4 , 5 または 6 の塩基配列の一部分からなる D N A が挙げられる。

本発明の D N A を得る方法は特に限定されず、上記新規遺伝子の取得方法によって得た遺伝子をそのまま、あるいはその一部のみを用いても良いし、該配列を有する D N A を化学合成によって作製しても良い。

本発明の蛋白質としては、(1) 配列番号 1 、 2 または 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質、(2) 配列番号 1 、 2 または 3 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、が挙げられる。これら蛋白質を得る方法は特に限定されないが、例えば、遺伝子工学的に大腸菌、動物細胞等を宿主とし、先の本発明の D N A を

ベクターに組み込んで形質転換し、該形質転換体を培養して得ることができる。

ここでのベクターへの組み込みや形質転換方法、その培養方法などは、公知の方法を用いることができる。

本発明において、これらのP H H I 患者の脾臓で特異的に発現している遺伝子
5 から由来するDNA、及びそのDNAから翻訳される蛋白質を用いれば、次に述べるような方法で様々な細胞種を含む組織あるいは細胞集団から、増殖しているインスリン産生細胞／脾 β 細胞を検出し、それを選抜することができる。

目的の組織または細胞集団からRNAを抽出し、特異的遺伝子に由来する本発明のDNAを適当な方法、たとえば放射性同位元素 ^{32}P とDNA修飾酵素を用いて標識したものをプローブとしてノーザン解析を行う。目的の組織または細胞集団に増殖しているインスリン産生細胞／脾 β 細胞が存在すればオートラジオグラフィーにより検出される。また、目的の組織または細胞集団から抽出したRNAから合成したcDNAを鉄型として、本発明のDNAをプライマーとして用いてPCRを行うことによっても、増殖しているインスリン産生細胞／脾 β 細胞を検出することができる。
15

また本発明の蛋白質を抗原として認識する抗体を作製し、この抗体を用いて、免疫学的手法、たとえば組織免疫染色により、目的の組織または細胞集団から、増殖しているインスリン産生細胞／脾 β 細胞を検出することができる。また、この抗体を用いて、インスリン産生細胞／脾 β 細胞の増殖が関与する疾患を診断することができる。このような疾患としては、例えば、細胞増殖性の疾患、脾臓の疾患、神経の疾患等が挙げられ、なかでも、上記抗体は家族性持続性過インスリン性低血糖症の診断に好適に用いられる。
20

また、本発明の遺伝子は脾 β 細胞の自然増殖モデルであるP H H I 患者の脾臓に特異的に発現していることから、脾 β 細胞或いはそれと類縁の細胞の増殖または分化に関与していると考えられる。したがって、該遺伝子を由来とする本発明のDNAをインスリン産生細胞／脾 β 細胞及び、例えば神経細胞等のそれと類縁の細胞の前駆細胞、あるいは前駆細胞に相当する培養細胞、例えば胚性幹細胞や間葉系幹細胞等に導入し、発現させることによりそれらの細胞の増殖を促進させることができると考えられる。また、同様に本発明のDNAをインスリン

産生細胞／胰 β 細胞及び、例えば神経細胞等のそれと類縁の細胞の前駆細胞、あるいは前駆細胞に相当する培養細胞、例えば胚性幹細胞や間葉系幹細胞等に導入し、発現させることによりそれらの細胞のインスリン産生細胞や神経細胞への分化を誘導させることができると考えられる。これらの胚性幹細胞や間葉系幹細胞は、生体の生理機能を有する細胞であることが好ましい。ここで、生体の生理機能とは、*in vitro* または *in vivo* における高い分化能を意味する。これら導入発現の方法に関しては、通常行われる公知の方法を用いることができる。

10 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

(実施例 1) 新規遺伝子NC1, NC2及びNC3の取得方法

15 PHHI 患者の脾臓及び健常人の脾臓から RNAzol B (バイオテックス・ラボラトリーズ製) を用いて全RNAを抽出し、PolyATract messenger RNA isolation system (プロメガ製) によりポリA (+) RNAを精製した。このポリA (+) RNAから Riboclone cDNA Synthesis System (プロメガ製) を用いて2本鎖cDNAを合成した。PHHI 患者の脾臓由来及び健常人の脾臓由来の2本鎖cDNAをそれぞれ制限酵素DpnII (ニューイングランド・バイオラボ製) で完全切断し、フェノール処理により反応を停止した後、エタノール沈殿により切断したcDNA断片を回収した。回収したDNA断片を滅菌蒸留水に懸濁し、1.2 μ gのcDNA断片に対して8 μ gのR-Bg1-24 (aggcactctc
25 cagccctctcacccgcaの塩基配列を有するオリゴDNA) と4 μ gのR-Bg1-12 (gatctgcggta) を50 μ lのスケールでT4 DNAリガーゼ (ニューイングランド・バイオラボ製) を用いて14°C、16時間の反応により結合させた。反応産物のDNA濃度を6 μ g/mlとなるように調製し、このうち1 μ l分を分取してR-Bg1-24をプライマーとしてPCR

R反応により増幅させた。PHH I 患者肺臓由来の増幅産物をテスター、健常人肺臓由来の増幅産物をドライバーと呼ぶ。テスター及びドライバーをDpnIIで切断することによりR-Bg1-24、R-Bg1-12オリゴDNAを除去し、テスターのみに別のオリゴDNA J-Bg1-24 (accggacgtcg
5 aactatccatgaaca)、J-Bg1-12 (gatctgttcatg) を結合させた。オリゴDNAを結合させたテスター0.4μgに対し100倍量(40μg)のドライバーを加え、エタノール沈殿させた後4μlのEE×3緩衝液[30mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-3-propane sulfonic acid (シグマ製)
10 ; 3mM EDTA (pH 8.0)]に懸濁した。このDNA溶液を98°C 5分間の熱処理で変性した後、67°Cで20時間保持してアニールさせ、TE緩衝液[10mM Trizma Base (シグマ製) ; 1mM EDTA (pH 8.0)]を加えて400μlとした。このうち10μlを分取し、72°Cで3分間保持してJ-Bg1-12をcDNAからはずし、5単位のTaqポリメラーゼ(ニューアイラングランド・バイオラボ製)を添加してさらに5分間反応させて1本鎖になった部分を2本鎖にした。この反応産物を鋳型として95°C 1分間/70°C 3分間 10サイクルのPCR反応を行い、増幅産物をフェノール処理、エタノール沈殿し、400μlの0.2倍濃度TE緩衝液に懸濁し、40単位のMung Bean Nuclease(ニューアイラングランド・バイオラボ製)を加え、30°Cで35分間反応させた。この反応産物をDP1と呼ぶ。10μlのDP1にプライマーとして2μgのJ-Bg1-24を加え、95°C 1分間/70°C 3分間 18サイクルのPCR反応を行って得られた増幅産物をDpnIIで切断し、1.2μgのcDNA断片に対し8μgのN-Bg1-24 (aggcaactgtgctatcgaggaa)、4μgのN-Bg1-12 (gatcttccccatcg) を結合し、以下DP1を得た手法に準じてDP2を得た。DP2をN-Bg1-24をプライマーとしたPCR反応により増幅し、DpnII 切断後J-Bg1-24、J-Bg1-12を結合し、同様にしてDP3を得た。J-Bg1-24をプライマーとしたPCR反応(95°C 1分間/70°C 3分間 22サイクル)によりDP3を増幅し、得られた増

- 幅産物をD p n II で切断後、p U C 1 9のB a m H I 部位にサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、G e n B a n k 等の塩基配列データベースを検索したところ、それらのうち3個のクローンがデータベース上のあらゆる塩基配列と一致しなかった。さらにこれらのクローンをプローブとしてc
5 DNAライブラリーをスクリーニングし、全長c D N Aを得、それぞれN C 1、N C 2、N C 3とした。

(実施例2) ノーザン解析による増殖しているインスリン細胞／胰 β 細胞の検出

- 10 実施例1で得られたN C 1（配列番号4）、N C 2（配列番号5）及びN C 3（配列番号6）の遺伝子配列の一部分のDNAを用いて、目的の組織中に増殖しているインスリン産生細胞が含まれているか否かをノーザン解析により検討した。
健常人の肺臓（レーン1及びレーン2、2検体）及びP H H I 患者の肺臓（レーン3、1検体）からT R I z o 1（ギブコ・ライフテックオリエンタル社製）
15 を用いて全RNAを抽出し、精製した。これらを1. 0%アガロースゲル電気泳動により分画した後、ナイロンメンプラン（ハイボンドーN、アマシャム・ファルマシア社製）にキャピラリー法により転写した。配列番号4の174～904番目の塩基配列からなるDNA、配列番号5の79～2115番目の塩基配列からなるDNA、配列番号6の28～384番目の塩基配列からなるDNAを、それぞれP C R法により増幅し、アガロースゲル電気泳動により分画した後、目的のDNA断片をゲルから切り出し、精製した。これらをT 4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造製）と[γ -³²P]AT P（アマシャム・ファルマシア社製）を用いて放射能標識し、ノーザン解析用のプローブとした。RNAを転写したナイロンメンプランと放射能標識したプローブを混合して65℃で1晩ハイブリダイ
20 ゼーションを行った後、メンプランを洗浄し、オートラジオグラフィーによりプローブと反応するRNA分画を検出した（図1）。N C 1、N C 2及びN C 3由來の部分配列のDNAのいずれも、それをプローブとして用いた場合に、P H H I 患者由來のRNAからはシグナルが検出されたが、健常人由來のRNAからは検
25 出されなかった。

(実施例3) 細胞の分化に伴うNC3の発現の変化

ラットインシュリノーマから樹立されたRIN-m細胞のインスリン産生能は低いが、酪酸ナトリウムを培養系に加えることによりインスリンを高濃度に分泌するようになり、インスリン産生細胞に分化することが示されている (Bart holomeuszら、Endocrinology 24巻、2680-2685頁、1989年)。RIN-m細胞を6mMの酪酸ナトリウム存在下で16時間培養した後、全RNAを抽出し、配列番号6の28~384番目の塩基配列からなるDNAをプローブとして、実施例2に記載したものと同様の方法でノーザン解析を行った。その結果、図2のAに示したように、酪酸ナトリウムを加えて培養したRIN-m細胞ではNC3遺伝子の発現が亢進していた。

また、副腎褐色細胞腫由来のPC-12細胞は神経成長因子(NGF)を添加することにより神経突起を伸展し、神経細胞様に分化することが知られている (Salteiら、Bioessay 16巻、405-411頁、1994年)。NGFを50ng/mlの濃度になるように加えた培養系で16時間培養したPC-12細胞から全RNAを抽出し、配列番号6の28~384番目の塩基配列からなるDNAをプローブとして、同様の方法でノーザン解析を行った。図2のBに示したように、NGFを加えて培養したPC-12細胞ではNC3遺伝子の発現が亢進していた。

20

(実施例4) NC1遺伝子を強制発現させたPC-12細胞の形態変化

配列番号4に記載されている塩基配列のうち、配列番号1のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする領域である174~904番目の塩基配列部分のDNAを動物細胞用遺伝子発現ベクターであるpCineoの所定の部位に組み込み、NC1遺伝子発現ベクターを構築した。このものをリポソーム法によりPC-12細胞に導入し、強制発現させた。geneticinを500μg/mlの濃度で加えた培養系で細胞を維持し、発現ベクターを保持した細胞を選択した。図3に示したようにNC1遺伝子を強制発現させたPC-12細胞の中には神経突起を伸張させた細胞が観察され、NC1遺伝子の強制発現によりPC-12細胞

を神経細胞様に分化させることができることが示唆された。

産業上の利用の可能性

本発明によって見いだされた新規遺伝子は、P H H I 患者の胰臓に特異的に発現しているだけでなく、細胞の分化・増殖に伴って発現が変化したり、未分化の細胞に遺伝子工学的手法により強制発現させることにより機能を有する細胞への分化を誘導させうるものである。したがって、これらの遺伝子、及びその一部のDNAやそれらから翻訳される蛋白質を用いて、増殖能を有するインスリン産生細胞を容易に検出し、それらを選抜すること、さらにはインスリン産生細胞を分化・増殖させることが可能となる。さらにはインスリン産生細胞である胰 β 細胞、及びそれと類縁の細胞（たとえば神経細胞等）の分化・増殖の異常に起因する種々の疾患の新たな診断法が開発できる。

請求の範囲

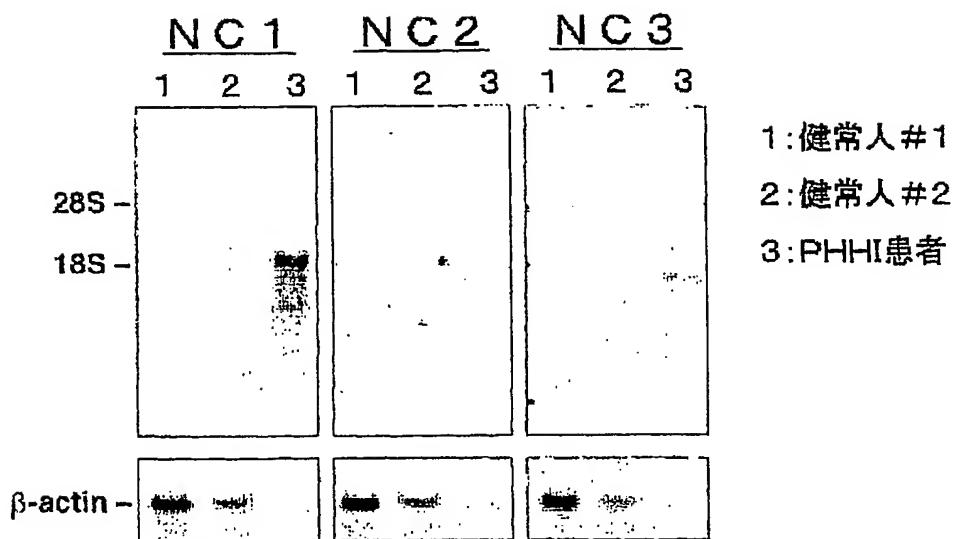
1. 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。
- 5 2. 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質。
3. 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
- 10 4. 配列番号4、5または6で表される塩基配列からなるDNA。
5. 配列番号4の174～904番目の塩基配列からなるDNA、配列番号5の79～2115番目の塩基配列からなるDNAまたは配列番号6の28～384番目の塩基配列からなるDNA。
- 15 6. 配列番号4、5または6で表される塩基配列の一部からなるDNAであって、少なくとも、請求の範囲第5項記載のDNAの塩基配列を有するDNA。
7. 請求の範囲第3～6項のいずれかに記載のDNAを用いて、増殖しているイ
20 ンスリン産生細胞を検出する方法。
8. 請求の範囲第3～6項のいずれかに記載のDNAを組み込んだベクターより得られる形質転換体。
- 25 9. 請求の範囲第3～6項のいずれかに記載のDNAを、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して胚性幹細胞または間葉系幹細胞を分化させる方法。
10. 請求の範囲第3～6項のいずれかに記載のDNAを、胚性幹細胞または間

WO 03/078631

PCT/JP03/02620

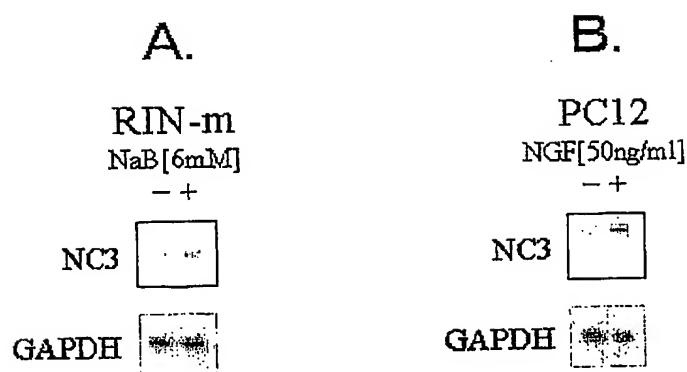
1/3

図 1



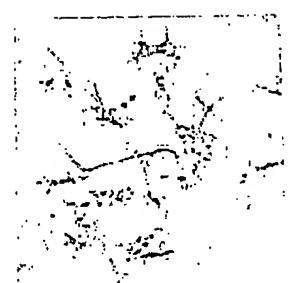
2/3

図 2

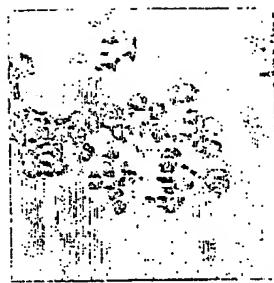


3/3

図 3



NC1



null

1/12

SEQUENCE LISTING

<110> 鎌淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120> 新規遺伝子

<130> T725.TEMNC-1

<150> JP P2002-071592

<151> 2002-03-15

<160> 6

<210> 1

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC1

<400> 1

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro

1

5

10

15

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr

20

25

30

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe

35

40

45

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile

2/12

50	55	60
Leu Glu Leu Ile Lys Glu Glu Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr		
65	70	75
Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asu Lys Phe Trp Tyr		
85	90	95
Cys Arg Lys Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asu Leu Glu		
100	105	110
Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asu Ser Leu Gln Asu Lys Leu		
115	120	125
Pro Val Ala Asu Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asu Cys Pro His		
130	135	140
Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu		
145	150	155
Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asu Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala		
165	170	175
Pro Asu Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asu Gly Leu Asn Ala Leu		
180	185	190
Leu Gly Lys Asu Met Met Ser Asu Leu Thr Arg Asn Asu Leu Asu Thr		
195	200	205
Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asu Leu Glu Asn Ile		
210	215	220
Gln Ile Pro Asu Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr		
225	230	235
Asp Phe Val Tyr Asu Cys Asn		
245		

<210> 2

<211> 679

<212> PRT

3/12

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC2

<400> 2

Met Asp Arg Val Thr Arg Tyr Pro Ile Leu Gly Ile Pro Gln Ala His
1 5 10 15
Arg Gly Thr Gly Leu Val Leu Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Tyr His
20 25 30
Leu Val Cys Met Gly Pro Glu Ala Ser Gly Trp Gly Gln Asp Glu Pro
35 40 45
Gln Thr Trp Pro Thr Asp His Arg Ala Gln Gln Gly Val Gln Arg Gln
50 55 60
Gly Val Ser Tyr Ser Val His Ala Tyr Thr Gly Gln Pro Ser Pro Arg
65 70 75 80
Gly Leu His Ser Glu Asn Arg Glu Asp Glu Gly Trp Gln Val Tyr Arg
85 90 95
Leu Gly Ala Arg Asp Ala His Gln Gly Arg Pro Thr Trp Ala Leu Arg
100 105 110
Pro Glu Asp Gly Glu Asp Lys Glu Met Lys Thr Tyr Arg Leu Asp Ala
115 120 125
Gly Asp Ala Asp Pro Arg Arg Leu Cys Asp Leu Glu Arg Glu Arg Trp
130 135 140
Ala Val Ile Gln Gly Gln Ala Val Arg Lys Ser Ser Thr Val Ala Thr
145 150 155 160
Leu Gln Gly Thr Pro Asp His Gly Asp Pro Arg Thr Pro Gly Pro Pro
165 170 175
Arg Ser Thr Pro Leu Asp Asp Asn Val Val Asp Arg Glu Gln Ile Asp

4/12

180	185	190
Phe Leu Ala Ala Arg Gln Gln Phe Leu Ser Leu Glu Gln Ala Asn Lys		
195	200	205
Gly Ala Pro His Ser Ser Pro Ala Arg Gly Thr Pro Ala Gly Thr Thr		
210	215	220
Pro Gly Ala Ser Gln Ala Pro Lys Ala Phe Asn Lys Pro His Leu Ala		
225	230	235
Asn Gly His Val Val Pro Ile Lys Pro Gln Val Lys Gly Val Val Arg		
245	250	255
Glu Glu Asn Lys Val Arg Ala Val Pro Thr Trp Ala Ser Val Gln Val		
260	265	270
Val Asp Asp Pro Gly Ser Leu Ala Ser Val Glu Ser Pro Gly Thr Pro		
275	280	285
Lys Glu Thr Pro Ile Glu Arg Glu Ile Arg Leu Ala Gln Glu Arg Glu		
290	295	300
Ala Asp Leu Arg Asp Gln Arg Gly Leu Arg Gln Ala Thr Asp His Gln		
305	310	315
Glu Leu Val Glu Ile Pro Thr Arg Pro Leu Leu Thr Lys Leu Ser Leu		
325	330	335
Ile Thr Ala Pro Arg Arg Glu Arg Gly Arg Pro Ser Lys Tyr Val Gln		
340	345	350
Arg Asp Ile Val Gln Glu Thr Gln Arg Glu Glu Asp His Arg Arg Glu		
355	360	365
Gly Lys His Val Gly Arg Ala Ser Thr Pro Asp Trp Val Ser Glu Gly		
370	375	380
Pro Gln Pro Gly Leu Arg Arg Ala Leu Ser Ser Asp Ser Ile Leu Ser		
385	390	395
Pro Ala Pro Asp Ala Arg Ala Ala Asp Pro Ala Pro Glu Val Arg Lys		
405	410	415

5/12

Val Asn Arg Ile Pro Pro Asp Ala Tyr Gln Pro Tyr Leu Ser Pro Gly
420 425 430

Thr Pro Gln Leu Glu Phe Ser Ala Phe Gly Ala Phe Gly Lys Pro Ser
435 440 445

Ser Leu Ser Thr Ala Glu Ala Lys Ala Ala Thr Ser Pro Lys Ala Thr
450 455 460

Met Ser Pro Arg His Leu Ser Glu Ser Ser Gly Lys Pro Leu Ser Thr
465 470 475 480

Lys Gln Glu Ala Ser Lys Pro Pro Arg Gly Cys Pro Gln Ala Asn Arg
485 490 495

Gly Val Val Arg Trp Glu Tyr Phe Arg Leu Arg Pro Leu Arg Phe Arg
500 505 510

Ala Pro Asp Glu Pro Gln Gln Ala Gln Val Pro His Val Trp Gly Trp
515 520 525

Glu Val Ala Gly Ala Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Ser Gln Ser Ser
530 535 540

Asp Leu Leu Glu Arg Glu Arg Glu Ser Val Leu Arg Arg Glu Gln Glu
545 550 555 560

Val Ala Glu Glu Arg Arg Asn Ala Leu Phe Pro Glu Val Phe Ser Pro
565 570 575

Thr Pro Asp Glu Asn Ser Asp Gln Asn Ser Arg Ser Ser Ser Gln Ala
580 585 590

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Tyr Ser Val Ser Glu Ser Pro Phe Phe Ser
595 600 605

Pro Ile His Leu His Ser Asn Val Ala Trp Thr Val Glu Asp Pro Val
610 615 620

Asp Ser Ala Pro Pro Gly Gln Arg Lys Lys Asp Gln Trp Tyr Ala Gly
625 630 635 640

Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ile Asn Ser Glu Val Leu Glu Ala Ile Arg

6/12

645 650 655
Val Thr Arg His Lys Asn Ala Met Ala Glu Arg Trp Glu Ser Arg Ile
660 665 670
Tyr Ala Ser Glu Glu Asp Asp
675

<210> 3

<223> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC3

<400> 3

Met Ala Asp Gly Leu Phe Arg Arg Arg Pro Trp Gly Leu Glu Gln Ile
1 5 10 15
Arg Pro Asp Pro Glu Ser Glu Gly Leu Phe Asp Lys Pro Pro Pro Glu
20 25 30
Asp Pro Pro Ala Ala Arg Gly Pro Arg Ser Ala Ser Ala Ala Gly Lys
35 40 45
Lys Ala Gly Arg Arg Ala Gly Gly Arg Ala Gln Gly Gly Arg Ala Gly
50 55 60
Gln Pro Pro Lys Ala Ala Ser Arg Pro Pro Pro Lys Lys Glu Ala Pro
65 70 75 80
Pro Leu Asp Glu Gly Cys Tyr Leu Asp His Phe Pro His Leu Ser Ile
85 90 95
Phe Ile Tyr Ala Ala Ile Ala Phe Ser Ile Thr Ser Cys Ile Phe Thr

7/12

100

105

110

Tyr Ile His Leu Gln Leu Ala

115

<210> 4

<211> 2109

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (174)...(904)

<223> NC1

<400> 4

atgttcacat ggctcaactg gaaacctgtt tcatgaacaa gcttactcag gaaccatctg 60
gtggatttcc agcacattgt tcttcagggg gacgactcta agtcgccttg tggtggcagc 120
agcttagaat cagtatttgt ggttggaaa gatggactta cgggagcttg gtaatgcagg 180
tggtaagga gcaggttatg agagcactta caaccaagcc tagctccctg gaccagtica 240
agagcaaact gcagaacctg agctacactg agatccctgaa aatccgccag tccgagagga 300
tgaaccagga agatttccag tcccggccga ttttggact aaaggagaag attcagccag 360
aaatcttaga gctgatcaaa cagcaacgccc tgaaccgcct tgtgaaaggg acctgcctta 420
ggaaactcaa tgcccgccgg aggcaagaca agttttggta ttgtcggtt tcgccaatac 480
acaaaactcct gcattacgga gacttagaag agagtcctca gggagaagtg ccccacgatt 540
ccttgcagga caaactgccc gtggcagata tcaaagccgt ggtgacggga aaggactgcc 600
ctcatatgaa agagaaaggt gcccttaaac aaaacaagga ggtgcttgaa ctcgccttct 660
ccatcttgta tgactcaaac tgccaaactga acttcatcgc tcctgacaag catgagtaact 720
gtatctggac agatggactg aatgcgctac tcggaaaggga catgatgagc gacctgacgc 780

8/12

ggaatgacct ggacaccctg ctcagcatgg aaatcaagct ccgcctcctg gacctggaaa 840
acatccagat ccctgacgca cctccggcga ttcccaagga gcccagcaac tatgacttcg 900
tctatgactg taactgaagt ggccggggccc agacatgccc ctccaaaac tggAACACCT 960
agctaacagg agagaggaat gaaaacacac ccacgccttg gaaccgtcct ttgttaagg 1020
gaagctgtgg gtccacatc cttcagcat cacctctagc cctggcaact ttcaGCCCCT 1080
agctggcatc ttgctcaccg ccctgattct gttcctcggc tccactgctt caggtcactt 1140
cccatggctg cagtccactg gtggacaag agcaaAGCCC actgccagta agaaggccaa 1200
agggcccttc catcctagcc ctctgcaggc atgccttcc ttcccttggg caggAAAGCC 1260
agcagccccca gactgcccAA aacttgcCC accagaccaa gggcagtGCC ccaaggcccc 1320
tgtctggagg aaatggccta gctatttgat gagaagacca aaccccacat cctccTTTCC 1380
cctctotcta gaatcatctc gcaccaccag ttacacttga attaagatct gcgtcaaat 1440
ctcctccac ctcttcctt gctttgcct tgctctgttc ctctttggc ccaagagcag 1500
cagccgcagc ctctcgtag tcctccctag cataaatttc ccaaacagtc cacaggtccc 1560
atgcccactt tgcgtctgca ctgtgatgt gacAAatctt ccctccac cagctagtct 1620
ggggTTTCCt ctccctGCCc cagggcagaa ctgccttctt catttccacc caegctccc 1680
gcctcttagc tgaaagcaca aatggtgaaa tcagtagtct cgctccatct ctaatagact 1740
aaacctaataat gcctcttagga cggactgttg ctatccaAGC gtttgggtt accttctcct 1800
gggagggtct gctgcaactc aagttccaca ggatggtaa gctgtcagac atccaagttt 1860
acatcatgt aatttattact ggtatttaca atttgcaaga gttttgggtt agtttttttt 1920
ttttttttt tgctttgttt ttgtacaaaa gagtctaaca ttttttgcCA aacagatata 1980
tatTAATGA aaagaagaga tacataaAtG tgtgaatttc cagttttttt ttaatttatt 2040
ttaatcccaa acatcttcct gaaaataaca ttcccttaaa catgctgtgg aataaaatgg 2100
attgtgatg 2109

<210> 5

<211> 2846

<212> DNA

<213> Homo sapiens

9/12

<220>

<221> CDS

<222> (79)...(2115)

<223> NC2

<400> 5

tttccttctc ctccctcagt aagcccagag gtctccaccc cacgggagga aggctgaggc 60
caagaccccg gaagagatata ggaccgcgtg accagatacc ccatcctggg catccctcag 120
gcacaccgtg gcaccggcct ggtgctggat ggagacacca gctacacata ccatctggtg 180
tgcattggcc ccgaggccag cggctgggc caggatgagc cgtagacatg gccactgac 240
cacagggccc agcagggcgt gcagaggcag ggggtgtcct acagcgtgca tgcctacact 300
ggccagccgt ccccacgggg gctccactcg gagaacaggg aggtgaggg ttggcaggtt 360
taccgcctgg ggcgcaggaa tgccaccag ggacgtccaa catggcact ccgcccagag 420
gacggggagg acaaggagat gaagacctac cgcctggatg ctggggacgc tgaccccagg 480
aggctgtgtg acctggagcg ggagcgctgg gccgtcatcc agggccaggg agtcaggaag 540
agcagcaccg tggccacgct ccagggcact cctgaccacg gagaccccg gaccccccggc 600
ccacctcggt ccacgcccct ggaggagaac gtggttgaca gggagcagat tgacttcctg 660
gcagcgagac agcagtccct gagtctggag caggcgaaca agggggcccc tcatagctcc 720
ccggccaggg ggacccctgc aggcacaacc ccaggggcca gccaggcccc caaggccttc 780
aacaagcccc acctggccaa cgggcacgtg gttcccatca agccccaggt gaaggggggtg 840
gtcagggaaag agaacaaggt gcgtgctgtg cccacctggg ccagtgtcca agttgtggat 900
gaccctggct cttggcctc agtggagatcc cgggggaccc ccaaggagac gcccatcgag 960
cgggagatcc gtctggctca ggagcggtgag gcagacgtgc gagagcagag ggggcttcgg 1020
caggcaaccg accaccagga gctgggtggaa atccccacca ggccgtctg gaccaagctg 1080
agcctgatca cagccccacg gcggggagaga gggcgccccgt ccctctacgt gcagcgggac 1140
atagtagcagg agacacagcg tgaggaagac caccggcggg agggcctgca cgtgggcccc 1200
gcgtccacac cccactgggt ctgggggggt cccagcccg gactccggag agccctcagc 1260
tcagattcca tcctcagccc ggccccagat gcccgtggg ccgaccacgc tccagaagtg 1320
aggaaggtga accgcattccc acctgatgcc taccagccgt acctgagccc cgggacccccc 1380

10/12

cagctagaat tctcagcattt cggagcattc ggcaagccca gcagtcttc cacagcggag 1440
gccaaggctg cgacttcacc aaaggccacg atgtccccga ggcatcttc agaatccct 1500
ggaaaacccc tgagcacaaa gcaagaggca tcgaagcccc ctcggggatg cccgcaagcc 1560
aacaggggtg tcgtgcggtg ggagtacttc cgcctgcgtc ctctgcggtt cagggcccc 1620
gacgagccca agcaggccca agtccccat gtctgggct gggagggtggc tggggcccc 1680
gcactgaggc tgcagaagtc ccagtcatct gatctgctgg aaagggagag ggagagtgtc 1740
ctgcgccggg agcaagaggt ggcagaggag cggagaaatg ctctttccc agaggtcttc 1800
tccccaacgc cagatgagaa ctctgaccag aactccagga gtcctccca ggcattccggc 1860
atcacggca gttactcggt gtctgagtct cccttcttca gccccatcca cctacactca 1920
aacgtggcgt ggacagtggaa agatccagtg gacagtgtc ctccggca gagaagaag 1980
gagcaatggt acgctggcat caacccctcg gacggtatca actcagaggt cctggaagcc 2040
atacgggtga cccgtcacaa gaacgccatg gcagagcgt gggatcccg catctacgcc 2100
agtgaggagg atgactgagc ctcggatgg ggcgccacc ccctgccctg ccctgaccct 2160
cgtgggaact gccaagacca tcgccaagcc cccaccctag gaaatgggtc ctaggtccag 2220
gatccaagaa ccacagctca tctgccaaca atcccaccat gggcacattt gggactgttg 2280
ggttttcgt ttccgtttct atcttcctt agaaatgttt ctgccttgg ggtctaaagc 2340
tttgggat gaaatggac ccctgctgat tcttctgtct tctaagactt tgccaaatgc 2400
cctgggtcta agaaagaaag agaccgcgc ctccacttc aggtgttaatt tgcttccgct 2460
agtctgaggg cagagggacc ggtcaaagag ggtggcacag atcgcagcac cttgagggc 2520
tgcgggtctg agggaggaga cactcagctc ctccctctga gaagtccca gctgagaggg 2580
gagacctgcc ctttccaac cctggaaac catccagttc gagggaggag gccaaactcc 2640
cagtgcgtgg ggtccctgtc cagcctcaa acccttcacc ttggcacc cagccacacc 2700
tggtgacac aaagctctca catcgatagg atcccatgag gatggcccc ttcacctggg 2760
agaaaaagtga cccagtttag gagctggagg ggggtctttg tccccaccc ccaaactgcc 2820
ctgaaataaa cctggagtga gctgcc 2846

<210> 6

<211> 1556

<212> DNA

11/12

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (28)...(384)

<223> NC3

<400> 6

ctgacccacc tacccgcgat cctgcccatt gctgacggc tctttcgccg cagaccctgg 60
ggtgtccaggc agattcgcccc ggaccccgag tccgaaggcc tgtttgacaa gcctcccccg 120
gaagaccctc ccgctgcccc cgcccccagg tcggcgctgg ccgcgggcaa gaaggctggt 180
cgccgcgcgg gcgggagggc gcaggggggc cgccgcggc agcccccggaa ggccgcatacg 240
cgccccccgc ccaagaagga ggccctcca ctggacgagg gctgctatct cgaccatttt 300
ccgcacccctt ccatcttcat ctacgcagcc atcgccttct ccatcacccctc ctgcacatctt 360
acctatatcc atttacagct tgcctgagtg gccagcgccg gacgggtgg ggcgcaggacc 420
gagcggggag ggaaaggaa aacggggctc ggcattttgt gttttagaaac agcgctgcac 480
cccccttcatg tagctttcga tgcttgittc ttccgtctt tgttgtcaact atctttgtct 540
atcagtacga aagtacaaag tagctgcgg caatgaaata ggggtgtgt ttgcacctgc 600
aggttagggg tggaggcgtt tagaattttg ggggtgtgatt gagcccccgtt tataattaga 660
atgcggccctgg acccctacca ctctgtgacg tgggggcacg cgccaggatc ccatcatttt 720
gtgtttgggg agctcagagt gcgcacaatc ttggaatctt taaggatga gccagaccca 780
gacccgcggc cttctagaga gggteccggca gggaggggtcg gcgcctggc cccgggtgg 840
ccggagccct gtgatgctgc atgcggccca ggaggagcca gctgtgcccc agagttggcg 900
cgccgcagag aggacaagag cgccgcagcag gcaagctgg agggccggac tcggtaagt 960
gcgttcgtcg ggggtgtcgctg ctgcggccccc aggggctccg gctgaccacg actgtgtgtt 1020
tttcctgcct tagactttgt tgctgctgcc cggaggagtc gagactggta cccggaggag 1080
ctgtctcacc aggagaccac gtcctggaag tgtccggac tcgcggccgg tgtggctgca 1140
gacccgcggc gcacgcaggc ccagagctgg cgccactcctg aggtatggacac tctgggggcc 1200
ctagccgggg tccacgggag ggctgtcctt ggggactcta ggatggcttc gttctggccc 1260

12/12

ggctcacttc tggagctgtg agacccaaga caaaaggggc tgagggattt ctcattgaca 1320
agggttcgtg cgggaaaacc acatgatcc: tgggatttgt catcttaaga ctcaaaaggc 1380
ttaataccag gaaccacacctt ggcaagatata ttatcccacc ggcctatctt gtttactcat 1440
gaatgttaaa tgttaaaacg cagcgctcta accctgcata ttatttactt gcaaatgtct 1500
gtaatctgta attgtgatgc ctctgatgga ataaattatac ttttcagtc tcctct 1556

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ, GenBank, EMBL, PDB, GeneSeq, SwissProt, PIR, BIOSIS (STN),
MEDLINE (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/44159 A1 (ABBOTT LABORATORIES), 08 October, 1998 (08.10.98), Sequence Nos. 27, 42 & EP 973944 A1 & JP 2001-522238 A	1-3,6,8,14
X	WO 02/12262 A1 (GENE LOGIC, INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), Sequence No. 1 & AU 200183152 A	1-3,6,8,14
A	WO 95/28411 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE), 26 October, 1995 (26.10.95), & EP 789705 A1 & JP 9-512166 A & US 5863724 A	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 06 May, 2003 (06.05.03)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2003 (20.05.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02620

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 15-19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15 to 19 are relevant to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/02620

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. C17 C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ, GenBank, EMBL, PDB, GeneSeq, SwissProt, PIR,
 BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 98/44159 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 1998.10.08、配列番号27, 42 & EP 973944 A1 & JP 2001-522238 A	1-3, 6, 8, 14
X	WO 02/12262. A1 (GENE LOGIC, INC.) 2002.02.14、配列番号1 & AU 200183152 A	1-3, 6, 8, 14
A	WO 95/28411 A1 (Baylor College Medicine)	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06.05.03	国際調査報告の発送日 20.05.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 植原 克典 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 15-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 15-19 は、人体の診断方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	1995. 10. 26 & EP 789705 A1 & JP 9-512166 A & US 5863724 A	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.